

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ESTUDO DE PLANTA DA FAMÍLIA ANNONACEAE PARA ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIA
LARVICIDA EM *Aedes aegypti***

Estudante: Sophia Motta Grossi - 12/0135612

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Laila Salmen Espindola

Co-orientadores: Dr. Daniel Pecoraro Demarque

Brasília- DF

2018

SOPHIA MOTTA GROSSI

**ESTUDO DE PLANTA DA FAMÍLIA ANNONACEAE PARA ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIA
LARVICIDA EM *Aedes aegypti***

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em
Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito
parcial de obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Laila Salmen Espindola

Co-orientador: Dr. Daniel Pecoraro Demarque

Brasília-DF

2018

“Saber o que perguntar já é saber a metade”

Gregor Mendel

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente à Deus, pois sem Ele não haveria vida. Agradeço ao Universo pelas oportunidades que fazem meu coração vibrar (não apenas bater).

À minha família pelo apoio e por sempre acreditarem na minha capacidade.

À todas as minhas amigas pela força, afeto e compreensão.

As minhas amigas do colégio por estarem comigo há tantos anos, por vibrarem com as minhas vitórias e estarem sempre dispostas quando as coisas não foram fáceis.

Ao meu namorado e companheiro por sempre me acompanhar e me apoiar.

A Universidade de Brasília pelo maravilhoso presente que me deu, minhas incríveis amigas e companheiras que vou levar comigo sempre no coração.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, obrigada por deixarem a rotina cansativa mais leve e feliz.

À minha querida psicóloga Nayara, agradeço pela força, ajuda em meu autoconhecimento e apoio em um ano cheio de emoções.

Agradeço aos meus incríveis e únicos co-orientadores, Dr. Daniel Pecoraro Dermaque e Dr. Gustavo Claro Monteiro, pelos ensinamentos, paciência e dedicação para comigo.

Por último, porém não menos importante, agradeço a querida e admirada Professora Laila Salmen Espindola, pela confiança, apoio, oportunidade e ensinamentos dentro e fora do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília.

RESUMO

Aedes aegypti é o principal vetor de arboviroses de importância epidemiológica, são essas dengue, zika e chikungunya. O controle do vetor representa uma abordagem importante para evitar essas doenças, em razão da dificuldade em desenvolver vacinas seguras e eficazes. Outra problemática está relacionada aos vetores cada vez mais resistentes aos inseticidas disponíveis no mercado, além de causarem malefícios ao meio ambiente e aos organismos não-alvo. Portanto, o objetivo do presente trabalho é isolar e identificar substâncias com atividade larvicida de *A. aegypti* presentes em uma espécie da família Annonaceae. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília, no âmbito do Componente 1 do projeto ArboControl. O extrato Arbo0071 foi pré-fracionado em cartucho de SPE-DIOL, fracionado em coluna de Sephadex LH-20 e coluna de sílica gel. As frações foram testadas em larvas de *A. aegypti* da linhagem Rockfeller em estágio L3, onde apenas a fração ativa foi escolhida para o fracionamento subsequente. Após etapas de fracionamento, foi possível elucidar a molécula isolada utilizando técnica de Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear. Avanços na pesquisa são necessários para determinar os prováveis mecanismos de ação e realizar as possíveis alterações moleculares para potencializar a atividade larvicida.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the main vector of dengue, zika and chikungunya infections, which are relevant epidemiological arboviruses in the world. Safe and effective vaccines are not yet available for population. This makes vector control crucial to combating these diseases. One issue regarding the control of mosquitoes is the increasing number of vectors resistant to commercial insecticides. Moreover, the products available cause harm to the environment and affect non-target organisms. Therefore, the purpose of the present work is to isolate and identify substances with larvicidal activity against the larvae of *A. aegypti* from the extract Arbo0071. The research was carried out at the Laboratório de Farmacognosia from Universidade de Brasília, as part of the ArboControl Project. Hence, the extract was pre-fractionated in SPE-DIOL cartridge, fractionated on a SephadexLH-20 column and silica gel column. The resulting fractions were tested against *A. aegypti* larvae from the Rockefeller line at stage L3, where only the active fraction underwent subsequent fractionation steps. Finally, a molecule was isolated and elucidated using Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance techniques. Advances in this research are needed to elucidate probable mechanisms of action of the referred molecule and possible molecular changes to potentiate its larvicidal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Disseminação do vírus chikungunya no mundo	6
Figura 2. Estágios de desenvolvimento do <i>Aedes aegypti</i>	7
Figura 3. Exemplos de inseticidas. 1) DDT- organoclorado 2) Malathion- organofosforado 3) Carbaryl-carbamato 4) Deltametrina-piretróide	9
Figura 4. Pré-fracionamento em Extração em Fase Sólida, SPE-DIOL	13
Figura 5. Coluna em Sephadex LH-20	14
Figura 6. Amostra incorporada na coluna de sílica gel	16
Figura 7. Larvas de <i>Aedes aegypti</i> no terceiro estágio L3	17
Figura 8. Placa de teste contendo larvas L3	18

LISTA DE FIGURAS

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Relação das pré-frações e o sistema eluente	13
Tabela 2. Coluna de Sephadex LH-20: frações, peso e rendimento.	14
Tabela 3. Informações sobre os volumes e sistemas eluentes utilizados na coluna de sílica gel.....	15
Tabela 4. Coluna de sílica gel: frações, peso e rendimento.	16

LISTA DE FIGURAS

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DENV	Vírus da dengue
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
HRMS	High resolution mass spectrometry
CL_{50}	Concentração letal mediana
MeOH	Metanol
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
RMN	Ressonância magnética nuclear

LISTA DE FIGURAS

SOMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. DENGUE.....	2
1.2. ZIKA VÍRUS.....	4
1.3. CHIKUNGUNYA.....	5
1.4. <i>Aedes aegypt</i>	6
1.5. INSETICIDAS QUÍMICOS E A RESISTÊNCIA.....	8
1.6. ANONNACEAE.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. OBJETIVO GERAL.....	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3. MÉTODOS.....	13
3.1. PRÉ FRACIONAMENTO.....	13
3.2. FRACIONAMENTO.....	13
3.3. TESTE LARVICIDA.....	17
3.4. CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA- CL ₅₀	18
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

1. INTRODUÇÃO

Arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes na qual parte do ciclo replicativo acontece nos insetos. São transmitidos para seres humanos e animais por meio da picada de artrópodes hematófagos, como o *Aedes aegypti* (RUST, 2012; CHOUIN-CARNEIRO; DOS SANTOS, 2017). Existem cinco famílias virais de arbovírus que causam doenças em seres humanos e animais, essas são: *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014).

O *Aedes aegypti* é o vetor primário da dengue, chikungunya e zika (KOTSAKIOZI et al., 2017). As doenças transmitidas por vetores contribuem com 17% dos casos de doenças infecciosas. São mais comuns em áreas tropicais e subtropicais, e estão relacionadas às alterações ambientais, demográficas e sociais (OMS, 2014).

Essas doenças apresentam grande importância para a saúde pública, portanto fazem parte da Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública regulamentada pela portaria 204, de 17 de fevereiro de 2016 (BRASIL, 2016).

VI- notificação compulsória: comunicação obrigatória à autoridade de saúde, realizada pelos médicos, profissionais de saúde ou responsáveis pelos estabelecimentos de saúde, públicos ou privados, sobre a ocorrência de suspeita ou confirmação de doença, agravo ou evento de saúde pública, descritos no anexo, podendo ser imediata ou semanal (BRASIL, 2016, p. 2).

Atualmente não existem vacinas seguras e eficazes para controle dessas doenças, portanto o controle do vetor *Aedes aegypti* é fundamental (KOTSAKIOZI et al., 2017; ARAÚJO et al., 2015). Além disso, os sintomas dessas três arbovirose são semelhantes entre si, como dor muscular, dor nas articulações e cefaleia, e o tratamento se baseia apenas em amenizá-los (OPAS/OMS, 2018; OPAS, 2016; OMS, 2016b; OMS, 2017).

O controle do vetor consiste em quatro esferas principais, controle biológico, mecânico químico e legal. O controle químico diz respeito a utilização de produtos químicos como inseticidas e larvicidas. O biológico consiste na utilização de patógenos ou predadores, o controle mecânico destina-se a proteção, com ações relacionadas a eliminação de criadouros (ZARA et al., 2016). Já o controle legal dispõe da regularização de normas de condutas ligadas a controle

da dengue, relacionado ao manejo do trabalho dos agentes de saúde, assim como regulamentação das atividades comerciais e sua relação com as práticas de vigilância sanitária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Ressalta-se que o controle deve ser realizado nas quatro esferas como forma de evitar as arboviroses.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, além do controle do vetor, uma estratégia importante é interromper o contato desse com os seres humanos (OMS, 2018). Estudos evidenciam a presença de resistência a pesticidas ao longo dos anos (BRAGA; VALLE, 2007; MOYES et al., 2017). Desse modo, pesquisas visam a utilização de extratos de plantas e seus metabólitos para o controle do vetor, e com menor impacto ao ambiente (RODRIGUES et al., 2006; COELHO et al., 2009; CHANSANG et al., 2018).

Considerando-se o exposto, o presente trabalho busca colaborar com o controle do *Aedes aegypti*, à partir do isolamento de substâncias em extratos de plantas do Cerrado, com potencial efeito larvícida.

Este projeto de Trabalho de Conclusão de Curso foi realizada no Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília, no âmbito do Componente 1 do projeto ArboControl, portanto as informações referentes aos resultados encontrados foram mantidas em sigilo.

1.1.DENGUE

A dengue é um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae. É uma doença infecciosa, na qual os sintomas podem aparecer entre cinco a sete dias após a picada do mosquito (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*). A principal fonte de infecção e transmissão são as fêmeas do *Aedes aegypti*. Quando picam uma pessoa infectada, o sangue com vírus é ingerido e entre oito a doze dias, o mosquito é capaz de transmitir a doença. A espécie *Aedes aegypti* possui maior relação com a zona urbana, devido a domesticação do mosquito e suas características etiológicas, entretanto *Aedes albopictus* encontra-se em zonas rurais e semiurbanas (FUNASA, 2001; OPAS/OMS, 2018; VALLE; BRAGA, 2007; ZARA et al., 2016).

Existem quatro tipos de sorotipos, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Uma vez infectado por um desses sorotipos, o organismo produz imunidade, impedindo a reinfeção por este e imunidade parcial aos demais, porém a infecção por sorotipos diferentes apresenta a forma grave da doença (OPAS/OMS, 2018).

A infecção por dengue pode ser assintomática, leve ou grave. Não existe tratamento específico, este é apenas para aliviar os sintomas. Pode ocorrer na forma clássica, de baixa letalidade e na forma hemorrágica, com letalidade significativa. O diagnóstico é realizado através de exames laboratoriais (OPAS/OMS, 2018).

A dengue possui três fases: fase febril, fase crítica e fase de recuperação. A primeira fase se destaca por sintomas como febre alta, mialgias, cefaleias, eritema, entre outros. Os maiores problemas relacionados a essa fase, envolvem desidratação, distúrbios neurológicos e convulsões em crianças, ocasionados pela febre alta. Na fase crítica ocorre o desaparecimento da febre alta, e dependendo do grau da doença, o indivíduo pode apresentar hemorragias graves, comprometimento de órgãos e extravasamento de plasma. Na fase de recuperação (sobrevivência a fase crítica) há uma melhora no quadro geral da doença (OPAS/OMS, 2018).

Infecções por dengue estão presentes em mais de 100 países e aproximadamente 50 milhões de casos são esperados todo ano. Nas Américas possui um padrão endêmico epidemiológico com surtos a cada três a cinco anos. A primeira epidemia de dengue com confirmação laboratorial no Brasil foi em 1982, em Boa Vista, Roraima, os sorotipos identificados foram DEN-1 e DEN-4 (DICK et al., 2012; FUNASA, 2001).

1.2.ZIKA VÍRUS

O Zika vírus foi identificado pela primeira vez em Uganda no ano de 1947 em macacos. É um *flavivírus*, em que a primeira via de transmissão consiste na picada do mosquito *Aedes aegypti* contaminado. Após picar uma pessoa infectada o mosquito torna-se transmissor da doença. A segunda via de transmissão consiste na relação sexual sem proteção com indivíduos contaminados. Estudos destacam a presença do vírus em fluidos corporais, como por exemplo, no sêmen, saliva e em fluidos vaginais (OMS, 2016a; OMS, 2016b; FOY et al., 2011; NICASTRI et al., 2016; OPAS, 2016).

Os sintomas são parecidos com os da dengue, incluem febre, mialgia, mal-estar, cefaleia e dores nas articulações. Podem surgir de três a doze dias após a transmissão do vírus. Assim como em outras arboviroses, o diagnóstico é laboratorial e o tratamento se baseia apenas no alívio dos sintomas (OPAS, 2016; OMS, 2016b).

A maior preocupação em torno do Zika vírus está relacionada a microcefalia e a Síndrome de Guillain-Barré. A microcefalia é uma condição rara e sem tratamento específico. O bebê nasce com a cabeça pequena e esta não se desenvolve, podendo desenvolver convulsões, problemas físicos e de aprendizagem. A Síndrome de Guillain-Barré é uma doença autoimune que atinge o sistema nervoso periférico, gerando fraqueza muscular e possível perda da sensibilidade das pernas e/ou braços. Ainda não há estudos suficientes sobre a reincidência da infecção pelo Zika vírus (OMS, 2016c; OMS, 2016a).

A Organização Mundial da Saúde estabelece algumas recomendações com o objetivo de impedir a transmissão sexual do vírus. Os indivíduos que vivem em zonas de incidência de transmissão do vírus devem utilizar preservativos, assim como os que regressarem de zonas de risco, por pelo menos 8 semanas, mesmo sendo estes assintomáticos. No caso em que apresentarem sintomas, devem adotar práticas sexuais seguras por pelo menos 6 meses. Além disso, as mulheres que desejarem engravidar devem esperar 8 semanas se não apresentarem sintomas ou 6 meses na presença de sintomas, valendo para os dois parceiros (OMS, 2016b).

1.3.CHIKUNGUNYA

A chikungunya é causada por arbovírus do gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*, transmitido pelos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. O primeiro caso de epidemia foi registrado na Tanzânia entre 1952 e 1953, o que garantiu o nome da doença que em swahili (idioma local) significa “aqueles que se dobram”, devido as alterações apresentadas em indivíduos contaminados, geradas pelas dores intensas nas articulações dos pés, mãos, dedos, tornozelos e pulsos. Esse sintoma contribui para a diferenciação da dengue, uma vez, que as dores são muito maiores. Assim como esta, a febre alta de início rápido, representa um dos sintomas principais. Ainda assim, existem casos de pacientes assintomáticos (BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ, 2014; OMS, 2017; OPAS, 2013).

O tratamento consiste, também, apenas no alívio dos sintomas. As dores nas articulações podem ser bem exacerbadas e debilitantes, com duração variada, dias, meses e até anos. Assim, o repouso é fundamental. Outros sintomas incluem cefaleia, fadiga e náuseas. A gravidade da doença é maior em idosos, crianças e gestantes. Não existe reincidência de infecção por chikungunya (FIOCRUZ, 2014; OMS, 2017; OPAS, 2013).

Em 2013, o vírus foi encontrado no Caribe, um ano depois se expandiu para as Américas. No Brasil, encontra-se majoritariamente nas áreas urbanas em todos os estados brasileiros (Figura 1) (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2015).



Figura 1. Disseminação do vírus chikungunya no mundo (FONTE: adaptado de SILVA et al, 2015).

1.4. *Aedes aegypti*

Conhecido comumente como mosquito da febre amarela, o *Aedes aegypti*, vetor primário da dengue, zika e chikungunya tem origem africana e sua distribuição geográfica é caracterizada pelo fluxo urbano e deslocamento populacional (KOTSAKIOZI et al., 2017).

Estudos como de Brown (2014) investigam a relação antropológica e como esses aspectos influenciaram na distribuição, evolução e adaptação desses vetores. Os hábitos domésticos, o comércio e o movimento humano favoreceram a presença desse vetor por todo o mundo, principalmente nas áreas de clima tropical e subtropical (GOULD et al., 2017).

O *Aedes aegypti* é classificado como mosquito principalmente urbano, de origem africana e distribuição mundial (BRAGA; VALLE, 2007). Se desenvolve por metamorfose completa apresentando quatro fases, sendo ovo, larva, pupa e adulto (FUNASA, 2001). É um

vetor artrópode hematófago, responsável pelo ciclo replicativo de arboviroses de importância mundial (CASSEB et al., 2013; MANIERO et al., 2016).

Machos e fêmeas se alimentam de néctar, porém as fêmeas utilizando o sangue para maturação dos ovos. Esses são depositados em superfícies próximas a água, com formato fusiforme e contorno alongado, com comprimento de 1 mm, inicialmente de cor branca, e em contato com o oxigênio escurecem. Em condições adequadas de umidade e temperatura, se desenvolvem em até 48 horas (Figura 2). Uma característica importante, é a alta resistência que esses ovos possuem a dessecação, o que contribui na dispersão e dificuldade de eliminação do *Aedes aegypti* (FUNASA, 2001; CHOUIN-CARNEIRO; DOS SANTOS, 2017).

A fase larval corresponde ao período de alimentação (material orgânico) e crescimento, é composta por quatro estágios evolutivos caracterizados por L1, L2, L3 e L4. Anatomicamente, são formadas por cabeça, tórax e abdômen. A respiração consiste através do sifão, uma estrutura tubular que se desloca até a superfície da água, são sensíveis a movimentos bruscos na água e a luz. Ademais, em condições inadequadas, ausência de alimentação e baixa temperatura, o estágio larval L-4 pode se alongar (FUNASA, 2001; CHOUIN-CARNEIRO; DOS SANTOS, 2017).

O terceiro estágio corresponde a pupa, dura entre dois e três dias, é a fase de transição do estado larval para adulto. A respiração ocorre por meio do par de tubos respiratórios localizados no cefalotórax (cabeça e tórax). É o último estágio imaturo, no qual não há alimentação (FUNASA, 2001; CHOUIN-CARNEIRO; DOS SANTOS, 2017).

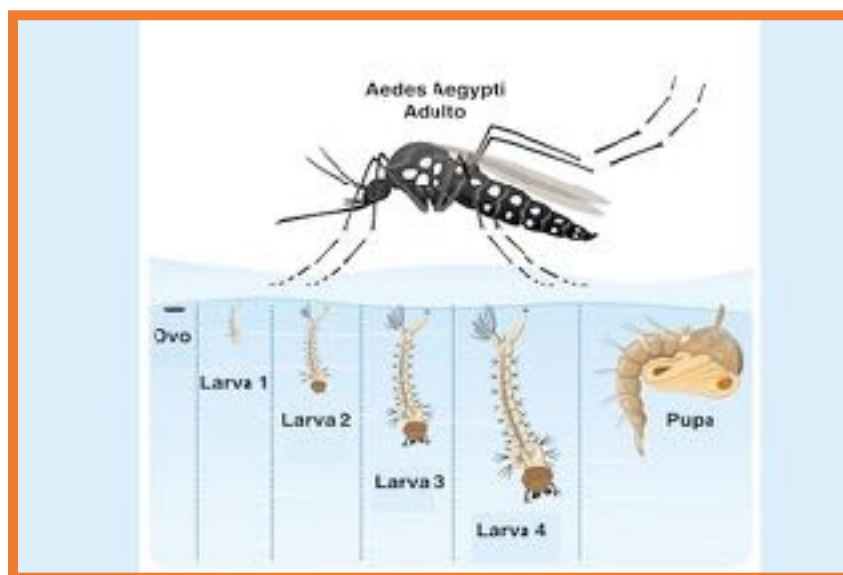


Figura 2. Estágios de desenvolvimento do *Aedes aegypti* (FONTE: Adaptado de Tua Saúde, 2016).

A fase adulta corresponde à forma conhecida comumente como mosquito. É nessa fase que ocorre a reprodução, as fêmeas atraem os machos pelo barulho produzido pelo som da batida da asa, e em uma única cópula produz todos os ovos. Logo após a transição da fase pupal para adulta, o *Aedes aegypti* permanece em pouso para o amadurecimento do exoesqueleto. É escuro com faixas brancas (FUNASA, 2001; CHOUIN-CARNEIRO; DOS SANTOS, 2017).

1.5. INSETICIDAS QUÍMICOS E A RESISTÊNCIA

Há ausência de vacinas eficazes e seguras disponíveis para dengue, zika e chikungunya, o que torna o controle do vetor imprescindível para a prevenção da infecção (BRAGA; VALLE, 2007; ARAUJO et al., 2015).

O objetivo principal do controle é limitar a presença desses vetores, ocasionando menor número de casos de infecções. O controle químico ainda é o mais utilizado, porém o crescimento e surgimento de novas resistências compreende um grande desafio atual envolvendo essas três doenças. Os produtos utilizados são classificados conforme grupo químico: carbamatos, organoclorados, organofosforados e piretróides (Figura 3). Alguns exemplos de mecanismos envolvidos na resistência, são alteração do sítio-alvo, redução da penetração do inseticida e resistência metabólica. A resistência metabólica ocorre por intermédio de reações enzimáticas que aumentam a capacidade de metabolização dos inseticidas. A maioria dos inseticidas químicos atuam no sistema nervoso central, a resistência pode ter ligação com o sítio de ação, podendo levar a uma resistência cruzada (BRAGA; VALLE, 2007; MOYES et al., 2017).

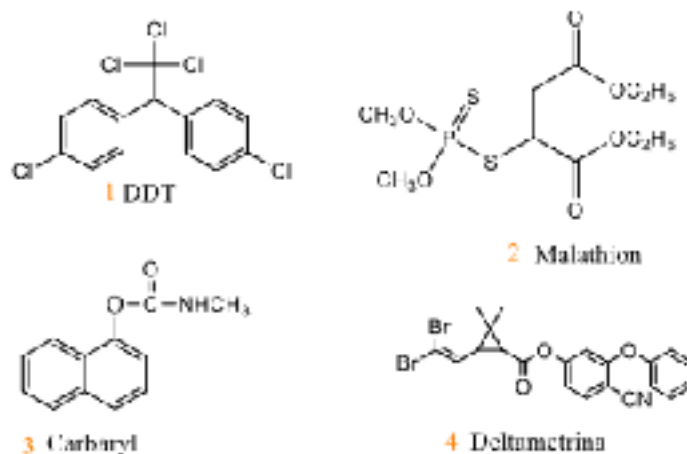


Figura 3. Exemplos de inseticidas. 1) DDT - organoclorado 2) Malathion - organofosforado 3) Carbaryl - carbamato 4) Deltametrina - piretróide

O primeiro inseticida químico de uso prolongado foi desenvolvido na Segunda Guerra Mundial, o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) da classe organoclorados, constituídos por carbono, cloro e hidrogênio (BRAGA; VALLE, 2007). Essa característica química favorece a insolubilidade em água e solubilidade em óleos e gorduras, favorecendo o acúmulo desse inseticida no tecido adiposo dos mamíferos e garantindo alta estabilidade, mantendo-se por muitos anos na natureza. Assim, começaram a ser sintetizados novos inseticidas, organofosforados e carbamatos (BRAIBANTE e ZAPPE, 2012).

Os organofosforados atuam impedindo a interrupção da propagação do impulso elétrico do inseto, são inibidores irreversíveis de acetilcolinesterase por meio da fosforização do receptor. São quimicamente instáveis e são ainda mais tóxicos que os organoclorados, porém permanecem menos tempo no meio ambiente (BRAGA; VALLE, 2007; BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

Os carbamatos são letais aos insetos, porém possuem pouca biodisponibilidade. Atuam por inibir a acetilcolinesterase reversivelmente, são solúveis em água e derivados da *Physostigma venenosum* (BRAGA; VALLE, 2007; BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

Os piretróides apresentam baixa toxicidade aguda em mamíferos e baixo impacto ambiental, porém podem ser potencialmente tóxicos para outros animais, tais como peixes, abelhas e lagostas. Conseguem exercer sua ação em baixas concentrações (SANTOS, AREAS, REYES, 2007). Os piretróides naturais sofrem rápida foto decomposição, assim iniciou-se a obtenção de piretróides sintéticos, que são facilmente decompostos pelo metabolismo dos

mamíferos, mas não pelos insetos (EMBRAPA, 1983).

Visando o manejo da resistência desses vetores é importante o desenvolvimento de novas substâncias com mecanismos de ação diferentes, que sejam ativas contra os mosquitos e inertes ao meio ambiente e a população (ZARA et al., 2016).

Compostos naturais representam uma alternativa para o manejo do controle de insetos, tais como os vetores da dengue, zika e chikungunya (ZARA et al., 2016).

Diversos trabalhos como Carvalho et al. (2011), Cavalcanti et al. (2004), Rodrigues et al. (2006) e Chansang et al. (2018), relatam a atividade de extratos de plantas e de seus compostos pelo efeito inseticida em *Aedes aegypti*. Compostos vegetais apresentam uma alternativa no controle do vetor das arboviroses.

1.6. Annonaceae

A família Annonaceae é composta por 2.500 espécies e 135 gêneros. No Brasil, são encontrados 29 gêneros e 386 espécies distribuídas na Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (LOPES e SILVA, 2014). É uma angiosperma com características primitivas, a polinização é realizada por coleópteros, que são atraídos pelo odor da fase feminina (estigmas). Esses insetos utilizam as flores dessa família para se alimentar, se proteger e acasalar. Quando terminada a liberação do pólen, as pétalas caem, repelindo esses insetos que carregam o pólen pelo corpo. As flores receptivas também emitem odor atrativo a esses insetos, e assim ocorre a polinização (SILVA; NETA, 2010; BOTANICA AMAZONICA, 1999).

As plantas dessa família, distribuídas em todas as regiões do Brasil, apresentam-se na forma de árvores, arbustos, subarbusto e liana/volúvel/trepadeira (MAAS, LOBÃO, RAINER, 2015). No Cerrado são comuns e amplamente distribuídas (LOPES; SILVA, 2014).

As plantas utilizam o metabolismo primário para funções vitais, como respiração e fotossíntese. O metabolismo secundário representa a interação da planta com o meio ambiente, atuam como mecanismos de proteção contra ataque de patógenos, competição, mudança de temperatura, entre outros (PERES, 2017).

Os metabólitos secundários produzidos por plantas dessa família são amplamente empregados na medicina. São encontrados, alcaloides, flavonoides, acetogeninas e esteroides (FORMAGIO et al., 2010; XAVIER et al., 2016). Os flavonoides apresentam ampla atividade, como antioxidante, antimicrobiana, antiviral e antitumoral (SOARES et al., 2000; MATSUMOTO,

2010). Acetogeninas apresentam atividade antitumoral, antiparasitária, antimicrobiana, citotóxica, imunossupressora e inseticida (MATSUMOTO, 2010; COSTA et al., 2013). Os alcaloides podem apresentar atividade antimicrobiana (HUFFORD et al., 1975), citotóxica e antiagregante plaquetário (SILVA et al., 2007). O potencial alelopático tem relação com os esteroides, flavonoides e terpenos (MATSUMOTO, 2010; FORMAGIO et al., 2010).

Estudos retratam atividade larvicida em *Aedes aegypti* de plantas da família Annonaceae (COSTA et al., 2013; MORAES et al., 2011; GERIS et al., 2008).

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Realizar o isolamento e identificação de substâncias presentes no extrato Arbo0071 com potencial atividade em larvas de *Aedes aegypti*, a fim de contribuir com o controle do mosquito vetor das arboviroses.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o pré fracionamento do extrato em fase sólida (SPE-diol)
- Testar as pré-frações em larvas no terceiro estágio de *Ae. aegypti*
- Realizar o fracionamento da pré-fração ativa por cromatografia em Sephadex LH-20 e sílica gel
- Reunir as frações obtidas segundo perfil em cromatografia de camada delgada
- Testar as frações em larvas no terceiro estágio de *Ae. aegypti*

- Analisar as frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)
- Elucidar a substância isolada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectrometria de massas
- Determinar o CL50 da substância isolada

3. MÉTODOS

3.1. PRÉ FRACIONAMENTO

Para o pré-fracionamento do extrato Arbo0071 foram utilizados 1,5414 g de amostra, diluída em uma pequena quantidade de hexano e distribuída homogeneamente em dez cartuchos de SPE-DIOL de 6 mL (Figura 5). Foram utilizados três sistemas eluentes: hexano (Arbo9A010A), acetato de etila (Arbo9A010B) e metanol (Arbo9A010C) (Tabela 1). Em cada sistema utilizou-se 6 mL de solvente, resultando em três pré-frações. As alíquotas foram concentradas em rotaevaporador (a pressão reduzida), transferidas para frascos pesados com pequena quantidade de solvente, colocadas no nitrogênio para total evaporação, cálculo de massa e rendimento. As pré-frações foram testadas de acordo com o descrito no item 3.3.



Figura 4. Pré-fracionamento em Extração em Fase Sólida, SPE-DIOL

Tabela 1. Relação das pré-frações e o sistema eluente.

Sistema eluente	Pré-fração
Hexano	Arbo9A010A
Acetato de Etila	Arbo9A010B
Metanol	Arbo9A010C

3.2.FRACIONAMENTO

O fracionamento da pré-fração ativa Arbo9A010B foi realizado em cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 em metanol (Figura 6). Uma alíquota de 1,2307 g da pré-fração foi aplicada na coluna e eluída com metanol. Foram obtidas 357 frações, as quais foram analisadas por placas de cromatografia em camada delgada (CCD; sistema de eluição: acetato de etila:metanol 7:3 para as primeiras 93 frações e hexano:acetato de etila 7:3 para as demais) e reunidas em 12 frações (Tabela 2). Essas frações foram testadas conforme item 3.3. A fração ativa (FR-B3) foi recromatografada em coluna de sílica gel utilizando gradiente de polaridade conforme a tabela 3.



Figura 5. Coluna de Sephadex LH-20

Tabela 2. Coluna de Sephadex LH-20: frações, peso e rendimento

Alíquotas (tubo de ensaio)	Frações	Peso amost ra (g)	Rendimen to (%)
94-104	Arbo9A019A	0,0627	5,0947
105-125	Arbo9A019B	0,1667	13,5451
126-140	Arbo9A019C	0,5767	46,8595
141-164	Arbo9A019D	0,1561	12,6838
165-240	Arbo9A019E	0,0089	0,7232
241-279	Arbo9A019F	0,0066	0,5363
280-285	Arbo9A019G	0,0016	0,1300
286-357	Arbo9A019H	0,016	1,3001
1-29	Arbo9A019I	0,0073	0,5932
30-37	Arbo9A019J	0,0076	0,6175
38-55	Arbo9A019K	0,0291	2,3645
56-93	Arbo9A019L	0,1655	13,4476

Tabela 3. Informações sobre os volumes e sistemas eluentes utilizados na coluna de sílica

Volume	Gradiente de eluição
250 mL	Hexano: Acetato de Etila 8:2
250 mL	Hexano: Acetato de Etila 7:3
250 mL	Hexano: Acetato de Etila 6:4
250 mL	Hexano: Acetato de Etila 4:6 (sistema utilizado 3x)
250 mL	Hexano: Acetato de Etila 2:8
100 mL	Acetato de Etila 100%
100 mL	Acetato de Etila: Metanol 1:1

Foram obtidas 125 frações, as quais foram analisadas em CCD (sistema de eluição Hexano: Acetato de Etila 7:3) e reunidas em 7 frações (Figura 7 e Tabela 4). Para avaliar o grau de pureza da fração ativa obtida na coluna de sílica, foi realizada análise analítica em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para a análise cromatográfica foi preparada uma solução de 1:1 utilizando metanol como solvente, o equipamento utilizado foi o Waters HPLC BreezeTM (bomba binária ou isocrática, injector automático ou manual, detector UV), com a coluna C18 SunFireTM, 4,6 x 150 mm; tamanho de partícula de 5 µm. O volume de injeção foi de 15 µL e o fluxo 1 mL/min. Foram utilizadas duas bombas de solvente, bomba A contendo água ultrapura e bomba B com MeOH 0,1% ácido fórmico (v/v). O método desenvolvido iniciou-se com 5% de B, mantendo-se isocrático por 2 minutos. Após esse período, foi realizado gradiente até 100% de B até 30 minutos. Mais 10 minutos foram adicionados ao final para lavagem e estabilização da coluna.

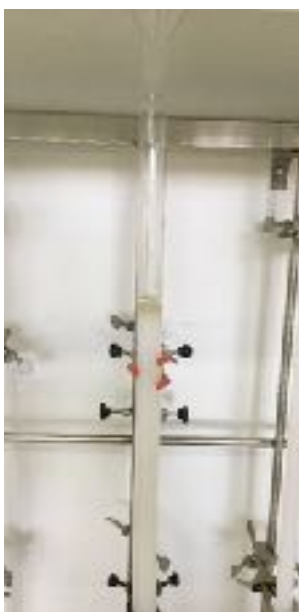


Figura 6. Amostra incorporada na coluna de sílica gel**Tabela 4.** Coluna de sílica gel: frações, peso e rendimento

Alíquotas	Frações	Peso amostra (g)	Rendimento (%)
Fração inicial (coletadas em erlenmeyer 250 mL)	Arbo9A026A	0,084	15,6047
Duas frações iniciais (erlenmeyer 250 mL) + 1-13 (tubos de ensaio)	Arbo9A026B	0,156	28,9801
14-27	Arbo9A026C	0,0109	2,0249
28-35	Arbo9A026D	0,0142	2,6379
36-38	Arbo9A026E	0,003	0,5573
39-60	Arbo9A026F	0,0296	5,4988
61-125	Arbo9A026G	0,0168	3,1209

As frações foram testadas e de acordo com os resultados da atividade biológica e as análises em CLAE, a fração Arbo9A026B foi analisada por infusão direta em espectrômetro de massas do tipo ESI-qTOF (HRMS) (AB Sciex TripleTOF5600+) em modo negativo de ionização. Foi preparada uma solução de 1 mg/mL em metanol. De acordo com o resultado obtido, foi calculada a fórmula molecular compatível considerando erro de até 5 ppm.

A amostra (Arbo9A026B) isolada foi diluída em clorofórmio deuterado (CDCl_3) submetido à análise por RMN (ressonância magnética nuclear) em aparelho Bruker Fourier com frequência de 600 MHz para o núcleo de hidrogênio (^1H) e de 150 MHz para o núcleo de carbono (^{13}C).

3.3.TESTE LARVICIDA

Para a realização dos testes larvicidas foram utilizadas larvas L3 da linhagem Rockfeller de *Aedes aegypti* (Figura 8), criadas pelo Insetário ArboControl do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. A sua manutenção é realizada em condições de temperatura e umidade adequadas, 25 a 28 °C, 70% de umidade relativa do ar e ciclo natural de foto período 12/12 horas, verificadas rotineiramente.

Para a criação de bandejas de bioensaios contendo aproximadamente cinco mil larvas são pesados 0,05 g de ovos de criação, obtidos pela ovoposição em papel de filtro por fêmeas de *Aedes aegypti*. A eclosão é realizada utilizando água de torneira e vácuo. Em cada ciclo é calculada a taxa de eclosão, para obter a média de larvas efetivas.



Figura 7. Larvas de *Aedes aegypti* no terceiro estágio L3

Todos os testes foram realizados em quadruplicata, utilizando placas de 12 poços, com dez larvas em cada poço e 3 mL de água (Figura 9). As leituras são realizadas em 24 e 48 horas. As amostras testadas são diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO), que também é utilizado como controle negativo. Para cada fração obtida o teste larvicida foi realizado em concentração de 125 µg/mL.



Figura 8. Placa de teste contendo larvas L3.

É realizada a leitura de cada quadruplicata individualmente, depois calculada a média e porcentagem de mortalidade.

$$\text{Média} = \frac{\text{Rep1} + \text{Rep 2} + \text{Rep 3} + \text{Rep4}}{4}$$

$$\% \text{ de mortalidade} = \frac{\text{Rep1} + \text{Rep 2} + \text{Rep 3} + \text{Rep4}}{4} \times 10$$

3.4. CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA - CL₅₀

Para a análise da atividade larvívora da amostra ativa foram realizados dois testes da concentração letal média em quadruplicata. Foram utilizados copos de 50 mL, 25 larvas L3 da linhagem Rockfeller e 20 mL de água. A amostra foi pesada e dissolvida em DMSO para a concentração final de 125 µg/mL, 100 µg/mL, 75 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL. Como controle negativo foi utilizado DMSO. Foi realizada a leitura do teste em 24, 48 e 72 horas. Os resultados obtidos foram analisados em software GraphPad Prism 5, onde o resultado de CL₅₀ foi convertido em log de base 10.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, H. R. C. et al. *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: Incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. *Insects*, v. 6, n. 2, p. 576– 594, 2015.

AZEVEDO, R. do S. da S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. da C. Chikungunya risk for Brazil. *Revista de Saude Publica*, v. 49, 2015.

BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ. Chikungunya: sintomas, transmissão e prevenção. 2014. Disponível em: <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/chikungunya-sintomas-transmissao-e-prevencao-3>>.

BOTANICA AMAZONICA. Annonaceae. 1999. Disponível em:< http://www.botanicaamazonica.wiki.br/labotam/lib/exe/fetch.php?media=reservaducke:prfd:g_ua:121_pfrd_1999_annonaceae_3.pdf>.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. 2017. *Aedes aegypti*: Inseticidas, Mecanismos de Ação e Resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. *Química Nova na Escola*, v. 34, n. 1, p. 10–15, 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria N° 204, de 17 de fevereiro de 2016. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências.

BROWN, J. E. et al. Human Impacts Have Shaped Historical and Recent Evolution in *Aedes*

aegypti, the Dengue and Yellow Fever Mosquito. *Evolution*, v. 68, n. 2, p. 514–525, 2014.

CARVALHO, G. H. F. et al. ATIVIDADE INSETICIDA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *Persea americana* (LAURACEAE) SOBRE LARVAS E PUPAS DE *Aedes aegypti* (DIPTERA, CULICIDAE). *Revista de Patologia Tropical*, Vol. 40 (4): 348-361. out.-dez, 2011.

CASSEB et al. Arbovírus: Importante Zoonose na Amazônia Brasileira. *Veterinária e Zootecnia*. 20(3), set, 2013.

CAVALCANTI, E. S. B. et al. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 99(5), August, 2004.

CHANSANG A. et al. Synergy in the adulticidal efficacy of essential oils for the improvement of permethrin toxicity against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasites and Vectors*, 11, 1, 1–16, 2018.

CHOUIN-CARNEIRO, T.; DOS SANTOS, F. B. Transmission of Major Arboviruses in Brazil: The Role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Vectors. *Biological Control of Pest and Vector Insects*, v. 2, p. Ch. 11, 2017.

COELHO, A. A. M.; DE PAULA, J. E.; ESPÍNDOLA, L. S. Atividade Larvica de Extratos Vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), em Condições de Laboratório. *Sociedade Entomológica do Brasil, Bioassay*, v. 4, n. 3, p. 1–6, 2009.

COSTA, M. da S. et al. Anonáceas provocam mortalidade em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Revista Brasileira de Biociências*, v. 11, n. 2, p. 184–190, 2013.

DICK, O. B. et al. Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 87, n. 4, p. 584–593, 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Unidade de execução de pesquisa de âmbito estadual- UEPAE- Porto Velho. INSETICIDAS PIRETROIDES NO CONTROLE DE PRAGAS. 1983. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/698066/inseticidas-piretroides-no-controle-de-pragas>>.

FORMAGIO, A. S. N. et al. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. *R. bras. Bioci.*, Porto Alegre, v. 8, n. 4, p. 349-354, out./dez. 2010.

FOY, B. D. et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE – FUNASA. Vigilância Epidemiológica. Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor. Brasília: Ministério da Saúde, abril. 2001. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf>

GERIS, R. et al. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 50, n. 1, p. 25–28, 2008.

GOULD, E. et al. Emerging arboviruses: Why today? *One Health*, v. 4, n. April, p. 1–13, 2017.

HUFFORD, C. D. et al. Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *liriodendron tulipifera* L. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 64, n. 5, p. 789–792, 1975.

KOTSAKIOZI, P. et al. Tracking the Return of *Aedes aegypti* to Brazil, the Major Vector of the Dengue, Chikungunya and Zika Viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 7, p. 1–20, 2017.

LOPES, J. de C.; MELLO-SILVA, R. Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 36, n. spe1, p. 125–131, 2014.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características Gerais e Epidemiologia dos Arbovírus Emergentes no Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 5, n. 3, p. 55–64, set. 2014.

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. 2015 *Annonaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110219>>.

MANIERO, Viviane C. et al. Dengue, Chikungunya e Zika Vírus no Brasil: Situação Epidemiológica, Aspectos Clínicos e Medidas Preventivas. Almanaque Multidisciplinar de Pesquisa, ANO III, vol.1, n.1, 2016.

MATSUMOTO, R. S. et al. Potencial alelopático do extrato foliar de *Annona glabra* L. (Annonaceae). Acta Botanica Brasilica, v. 24, n. 3, p. 631–635, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue (Série A. Normas e Manuais Técnicos.). Brasília- DF. 2009.

MORAES, M. J. et al. Avaliação da atividade de *Annona coriacea* (Annonaceae) sobre pupas e adultos de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) em laboratório. Revista de Agricultura (Piracicaba). 86. 115-121, 2011.

MOYES C.L. et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. PLoS Neglected Tropical Diseases, 11, 7, 1–20, 2017.

NICASTRI, E. et al. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy. Euro Surveill. 2016;21(32):pii=30314.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Chikungunya. 2017. Disponível em: < <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/ ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Dengue: informação geral. 2018. Disponível em: < https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4493:2010-informacion-general-dengue&Itemid=40232&lang=pt>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Doença do vírus Zika. 2016b. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/pt/>>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Factsheet Vector-borne diseases. 2014. Disponível em: < http://www.who.int/kobe_centre/mediacentre/vbdfactsheet.pdf>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICA DA SAÚDE. /ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Ficha de Dados Chikungunya. 2013. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=8303:2013- hoja-informativa-chikungunya&Itemid=40023&lang=es>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Microcefalia. 2016c. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/microcephaly/pt/>>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Prevenção de transmissão do vírus Zika por via sexual. 2016a. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204421/WHO_ZIKV_MOC_16.1_por.pdf;jsessionid=91237A34CBFCF867899D79D58310AA0F?sequence=5>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Vector control. 2018. Disponível em: < https://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/control_strategy_vector/en/>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Zika Vírus: Microcefalia, Sintomas e Tratamentos. 2016. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/zika-virus-microcefaliasintomas-e-tratamentos/>>.

PERES, L. E. P. Metabolismo secundário das plantas. 2017. Disponível em: < <http://www.oleosessenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/>>.

RODRIGUES, A.M.S. et al. Larvicidal Activity of Some Cerrado Plant Extracts Against *Aedes aegypti*. Journal of the American Mosquito Control Association, 22(2):314-317, 2006.

RUST, R. S. Human Arboviral Encephalitis. *Seminars in Pediatric Neurology*, v. 19, n. 3, p. 130–151, 2012.

SANTOS, M.; REYES, F.; AREAS, M. Piretróides – Uma Visão Geral. *Alim. Nutr.*, v. 18, n. 3, p. 339–349, 2007.

SILVA, C.; NETA, A. Aspectos reprodutivos e visitantes florais de *Duguetia marcgraviana* Mart. (Annonaceae) na região sudoeste de Mato Grosso. *Revista Biotemas*, v. 23, n. 1, p. 69–76, 2010.

SILVA, D.B. et al. ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE ALGUNS ALCALÓIDES OXAPORFÍNICOS OBTIDOS DE ANNONACEAE. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 8, 1809-1812, 2007.

SILVA, J.A.A. da Quem é quem na família das anonáceas. 2007. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_2/anonaceas/index.htm>.

SOARES, G. L. G. et al. Alterações químicas induzidas por coccídeos galhadores em folha de *Rollinia laurifolia* (Annonaceae). *Revista Brasileira de Zoociências*, v. 2, n. 1, p. 103–116, 2000.

TUA SAÚDE. Saiba como é o ciclo de vida do *Aedes aegypti*. 2016. Disponível em:< <https://www.tuasaude.com/ciclo-de-vida-do-aedes-aegypti/>>.

VALLE, D.; BRAGA, I. a. *Aedes aegypti* : Histórico do Controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 16, n. 2, p. 113–118, 2007.

XAVIER, M. N. et al. Composição química do óleo essencial de *cardiopetalum calophyllum* schltl. (Annonaceae) e suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. *Revista Virtual de Química*, v. 8, n. 5, p. 1433–1448, 2016.

ZARA, L.S.A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, n. 2, p. 1–2, jun. 2016.